

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.006

· 基础研究 ·

康莱特注射液调控胆固醇代谢以抑制肺腺癌 A549 细胞的恶性生物学行为

朱广辉^a, 郑琦^{ab}, 高瑞珂^a, 许博文^a, 徐曼曼^a, 李杰^a (中国中医科学院 a. 广安门医院 肿瘤科; b. 肿瘤研究所, 北京 100053)

[摘要] **目的:** 明确康莱特注射液(KLTi)通过调控胆固醇代谢对肺腺癌 A549 细胞恶性生物学行为的抑制作用。**方法:** 构建 A549 细胞体外培养模型, 设置空白对照组(CON组)、KLTi组、顺铂(DDP)组及 KLTi+DDP 组, 分别给予对应药物干预, 采用 CCK-8 法检测不同分组的药物干预对 A549 细胞增殖的影响, 并确定 IC₅₀ 值用于后续实验; 使用细胞划痕实验、平板克隆形成实验、Transwell 侵袭实验观察不同分组药物对 A549 细胞恶性生物学行为的影响; 流式细胞术检测不同分组药物对 A549 细胞晚期凋亡水平的影响; WB 法检测各组细胞上皮间质转化(EMT)相关蛋白表达, ELISA 法检测促炎因子释放水平。采用比色法检测细胞胆固醇含量水平的组间差异, 借助 WB 法检测胆固醇代谢相关膜通道蛋白 ATP 结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)及功能蛋白 ATP 柠檬酸裂解酶(ACLY)、肽基脯氨酰异构酶 B(PPIB)表达水平差异。**结果:** KLTi 及 DDP 对 A549 细胞抑制作用具有时间及剂量依赖性(均 $P < 0.05$), 最终选择 2 mg/mL KLTi、3 μg/mL DDP 作为干预剂量, 按分组加药干预 48 h 后显示, KLTi 单用或联合 DDP 均可抑制 A549 细胞克隆形成、迁移、侵袭能力且促进其晚期凋亡, KLTi+DDP 组的效果更加明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); KLTi 单用或联合 DDP 可通过调控 E-cadherin、vimentin、snail 蛋白表达从而影响 A549 细胞 EMT 进程($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 同时下调 IL-6 及 IL-8 的释放水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。KLTi 单用及联合 DDP 均可以明显降低 A549 细胞胆固醇含量($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并且对 ABCA1、ACLY、PPIB 表达具有调控作用, 联合组的效果更加明显($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:** KLTi 可能通过调控胆固醇代谢水平及相关通道蛋白抑制肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移、侵袭等恶性生物学行为及 EMT 进程。

[关键词] 康莱特注射液; 肺腺癌; A549 细胞; 胆固醇代谢; 增殖; 迁移; 侵袭; 上皮间质转化

[中图分类号] R734.2; R730.52; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2023)11-0973-08

Kanglaite injection regulates cholesterol metabolism to inhibit the malignant biological behavior of lung adenocarcinoma A549 cells

ZHU Guanghui^a, ZHENG Qi^{ab}, GAO Ruike^a, XU Bowen^a, XU Manman^a, LI Jie^a (a. Department of Oncology, Guang'anmen Hospital; b. Cancer Institute, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Kanglaite injection (KLTi) on the biological behaviors of lung adenocarcinoma A549 cells by regulating cholesterol metabolism. **Methods:** An *in vitro* monoculture model of A549 cells was established. A blank control group (CON group), a KLTi group, a cisplatin group (DDP group) and a KLTi + DDP group were set and given corresponding drug intervention, respectively. CCK-8 method was used to detect the effects of different interventions on the proliferation of A549 cells, and IC₅₀ values were determined for subsequent experiments. The effects of different drugs on the malignant biological behaviors of A549 cells were compared by cell scratch assay, plate clonogenesis assay and Transwell invasion assay, and the late apoptosis of A549 cells were detected by flow cytometry. The expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related proteins was detected by WB method, and the release level of pro-inflammatory factors was detected by ELISA. Colorimetric method was used to detect the difference of cholesterol content in 10⁶ cells among groups. The difference in the expression levels of membrane channel protein ATP binding cassette transport protein A1 (ABCA1) and functional proteins ATP citrate lyase (ACLY) and peptidylprolyl isomerase B (PPIB) related to cholesterol metabolism was determined by using WB assay. **Results:** KLTi and DDP inhibited A549 cells in a time- and dose-dependent manner (both $P < 0.05$). Finally, 2 mg/mL KLTi, 3 μg/mL DDP and 48 h of intervention were chosen as intervention dose for follow-up experiments. KLTi alone or combined with DDP could inhibit the clone formation, migration and invasion and promote the late apoptosis of A549 cells, with more prominent effect in the KLTi+DDP group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). KLTi alone or in combination with DDP could improve the EMT process of A549 cells by regulating the protein

[基金项目] 国家重点研发计划-中医药现代化研究专项(No. 2018YFC1707405); 中央高水平中医医院临床研究和成果转化能力提升项目-临床科研一体化人才专项(创新团队培育项目)(No.HLCMHPP2023001)

[作者简介] 朱广辉(1994—),男,博士,住院医师,主要从事恶性肿瘤中西医结合临床及机制研究。E-mail: zhugh0822@163.com

[通信作者] 李杰, E-mail: qfm2020jieli@yeah.net

expression of E-cadherin, vimentin and snail ($P<0.05$ or $P<0.01$) and down-regulate the release of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 ($P<0.05$ or $P<0.01$). KLTi alone or in combination with DDP could significantly reduce the cholesterol content of A549 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$) and had a regulatory effect on ABCA1, ACLY and PPIB, with more prominent effects in the KLTi+DDP group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion:** KLTi inhibits the proliferation, migration, invasion and EMT process of lung adenocarcinoma A549 cells possibly by regulating cholesterol metabolism levels and related channel proteins.

[Key words] Kanglaite injection (KLTi); lung adenocarcinoma; A549 cell; cholesterol metabolism; proliferation; migration; invasion; EMT
[Chin J Cancer Biother, 2023, 30(11): 973-980. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2023.11.006]

在中国,肺癌是发病率及病死亡率均排名第一的恶性肿瘤,其新发病例数持续上升,是癌症相关死亡的主要原因^[1-2]。非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)约占全部肺癌的80%~85%,其中以腺癌占比最大,鳞状细胞癌是第二常见的^[3]。代谢是癌症的中心机制,脂质代谢是代谢表型之一^[4-6]。研究^[7-9]发现,癌症存在脂质代谢异常的现象。代谢重编程现在已经被确定为癌症的一个标志^[10]。代谢酶、上游调控分子,以及下游代谢产物在各种代谢过程中发生改变^[11]。脂质是细胞的主要功能物质之一,脂质在细胞及其周围环境中的分布和代谢过程中被重新编程,会促进肿瘤细胞的增殖,高度增殖的癌细胞表现出强烈的脂质和胆固醇亲和性。鉴于脂质代谢途径对癌症有重要影响,针对脂质代谢的特定治疗似可改善肿瘤患者预后、增强抗肿瘤效果。

中西医结合治疗作为中国医疗行为的特色组成部分,临床参与肺癌的综合治疗具有疗效及安全性优势。康莱特注射液(Kanglaite injection, KLTi)于1997年获批上市,是由中国工程院院士、浙江中医药大学教授李大鹏领衔的科研团队运用超临界CO₂萃取等国际先进技术,从中药薏苡仁中提取分离出抗癌活性成分研制而成的静脉注射用乳剂。团队成员前期借助网络药理学的手段探究了KLTi抗NSCLC的有效成分及作用机制,发现其有效成分主要来自薏苡仁油,包括豆甾醇、豆甾醇 α 1、麦角甾醇等;同时KEGG分析发现,调控通路主要集中在脂肪细胞中脂解的调节、钙信号通路等代谢途径上^[12]。本研究以肺腺癌A549细胞为研究对象,使用KLTi单用或联合化疗作为干预措施,探讨KLTi对肺腺癌A549细胞恶性行为及胆固醇代谢途径的影响,为肺腺癌的治疗提供重要的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂

NSCLC细胞系A549来自美国ATCC公司。McCoy's 5A(改良)培养基、胎牛血清、青链霉素双抗、0.25% Trypsin-EDTA均购自美国Gibco公司,PMA购自美国Sigma公司,Cell Counting Kit-8(CCK-8)购自日本同仁化学公司,Matrigel Basement Membrane

Matrix购自美国Corning公司,Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自美国BD公司,BCA法蛋白定量试剂盒购自中国APPLYGEN公司,抗 β -actin兔源单抗(工作液1:1 000稀释)购自中国北京中杉金桥公司,抗上皮钙黏素(E-cadherin)(工作液1:1 000稀释)、抗波形蛋白(vimentin)(工作液1:1 000稀释)、抗snail(工作液1:500稀释)、抗ATP结合盒转运蛋白A1(ATP binding cassette transport protein A1, ABCA1)兔源单抗(工作液1:1 000稀释)购自美国CST公司,重组抗ATP柠檬酸裂解酶(ATP citrate lyase, ACLY)兔源单抗(工作液1:1 000稀释)、抗闭合蛋白(occludin)兔源单抗(工作液1:1 000稀释)均购自英国Abcam公司,抗肽基脯氨酰异构酶B(peptidylprolyl isomerase B, PPIB)兔源单抗(工作液1:1 000稀释)购自美国Proteintech公司,HRP标记的山羊抗兔IgG(H+L)购自美国Jackson公司,总胆固醇(Total Cholesterol, TC)比色法测定试剂盒Colorimetric Assay Kit购自中国伊莱瑞特生物科技股份有限公司,KLTi购自浙江康莱特药业有限公司,注射用顺铂(cisplatin, DDP)购自齐鲁制药有限公司。

1.2 细胞培养

A549细胞种子含10%胎牛血清的McCoy's 5A(改良)培养基,在37℃、5%CO₂的培养箱内培养。显微镜下观察细胞汇合度达到90%以上时,用0.25%胰酶消化细胞,1:3传代培养,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 CCK-8法检测KLTi与DDP对A549细胞的细胞毒性作用

将A549细胞调整密度为 5×10^6 个/mL,每孔100 μ L细胞悬液接种于96孔板中,置于37℃、5%CO₂培养箱中过夜。根据KLTi(20、10、5、2.5、1.25、0.625、0 mg/mL)、DDP(20、10、5、2.5、1.25、0.625、0 μ g/mL)的不同质量浓度将细胞各分为7组,每组药物6个复孔,同时根据药物作用时间分为24和48 h两亚组,分别向对应孔中加入含10% CCK-8溶液的新鲜完全培养基100 μ L/孔,37℃培养1~4 h。用酶标仪测定在450 nm处的光密度(D)值,待含有细胞的对照孔的D值为1时,进行读数记录。细胞增殖抑制率= $[(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100\%$,其中As为实验组光密度(含细胞、培养基、CCK-8溶液和药物溶

液),Ac为对照组光密度(含细胞、培养基、CCK-8溶液,不含药物),Ab为培养基光密度(含培养基、CCK-8溶液,不含细胞、药物)。使用GraphPad软件计算 IC_{50} 值。

1.4 A549细胞分组药物处理

根据1.3中计算的 IC_{50} 值,将A549细胞分为空白对照组(CON组)、KLTi组、DDP组及联合组,其中KLTi组加KLTi 2 mg/mL,DDP组加DDP 3 μ g/mL,联合组加KLTi 2 mg/mL+DDP 3 μ g/mL,按照实验要求分别处理24或48 h。

1.5 平板克隆形成实验检测KLTi及DDP对A549细胞增殖的影响

调整A549细胞密度500个/mL,吹匀后加入6孔板,每孔2 mL,摇匀后置于37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中过夜。配制各组含药培养基分别加入对应孔中后继续置于培养箱中48 h后,去除含药培养基并用PBS洗涤2次,置换空白培养基(无胎牛血清)继续培养。每3 d换新鲜空白培养基(无FBS),于光学倒置显微镜下观察,待绝大多数单个克隆团中细胞数大于50后终止培养(约12 d)。PBS洗涤,每孔加入1 mL 4%多聚甲醛,固定30~60 min后洗涤;每孔加入结晶紫染液1 mL,10~20 min后,PBS洗涤数次、晾干,数码相机拍照。

1.6 细胞划痕愈合实验检测KLTi及DDP对A549细胞迁移的影响

各组对数生长期A549细胞用0.25% Trypsin-EDTA消化,调整细胞密度为 2.5×10^5 个/mL,十字摇匀后置于37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 培养箱中48 h,用200 μ L移液枪头沿钢尺进行划痕,将配制好的各组含药培养基分别加入对应孔,分别于0、24、48 h在光学倒置显微镜下拍照,观察划痕愈合程度,用Image J软件计算痕迹所占面积,最后计算细胞迁移率:迁移率=(最终划痕面积-初始划痕面积)/初始划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.7 Transwell小室实验检测KLTi及DDP对A549细胞侵袭的影响

Transwell小室预铺基质胶检测细胞侵袭能力。将A549细胞悬液调整细胞密度为 5×10^5 个/mL,接种至Transwell小室,下层24孔板中加入含10%胎牛血清的培养液,置于培养箱中培养24 h。取出细胞后PBS洗涤,4%多聚甲醛室温固定10 min,结晶紫染色15 min,显微镜下观察,并使用Image J软件计算侵袭细胞所占面积。

1.8 流式细胞术检测KLTi及DDP对A549细胞凋亡的影响

收集按照不同分组完成干预的细胞,PBS洗涤重悬细胞,加入Annexin V-FITC和PI各10 μ L,混匀,4 $^{\circ}$ C避光处理30 min,加入PBS,行流式细胞术检测。

1.9 比色法检测KLTi及DDP对A549细胞胆固醇含

量的影响

用细胞刮刀将分组干预完成的细胞刮下,PBS清洗后取 2×10^6 个细胞加入200 μ L异丙醇,进行机械匀浆后在显微镜下观察无明显细胞沉淀,再重复进行4 $^{\circ}$ C、1 000 \times g离心10 min以收集上清液。按照试剂盒操作说明取2.5 μ L双蒸水加入空白孔(A孔),取2.5 μ L胆固醇标准品(5.17 mmol/L)加入标准孔(B孔),分别取各组待测样本2.5 μ L加入对应孔中(S孔);向各孔加入250 μ L酶工作液,37 $^{\circ}$ C反应10 min。设定酶标仪波长为510 nm,检测并读取各孔 D 值。计算待测样本中胆固醇的相对含量,公式为胆固醇相对含量[μ mol/(1×10^6 个细胞)]= $\Delta A_1 \div \Delta A_2 \times c \times f \div (N \div V)$,其中 ΔA_1 :样本 D 值-空白 D 值; ΔA_2 :标准 D 值-空白 D 值; c :标准品浓度(5.17 mmol/L); f :样本加入检测体系前稀释的倍数; N : 1×10^6 个细胞的份数; V :异丙醇的体积(mL)。

1.10 ELISA法检测KLTi及DDP对A549细胞上清液中细胞因子水平的影响

收集各组干预后细胞,取细胞上清液,严格按照试剂盒说明书步骤完成标准曲线绘制、反应等操作,结束后以标准物 D 值为横坐标,标准物浓度为纵坐标,计算出标准曲线的二次回归方程式,将样品 D 值代入方程式,计算所得数据即为细胞上清液中细胞因子的实际浓度。

1.11 WB法检测KLTi及DDP对A549细胞EMT进程和胆固醇代谢相关蛋白表达水平的影响

收集各组干预后细胞,经细胞裂解液处理后提取细胞总蛋白,BCA法测定细胞蛋白浓度,完成WB法的电泳、转膜、免疫杂交、化学发光等操作过程,检测A549细胞EMT相关蛋白(E-cadherin、vimentin、snail)及胆固醇代谢相关蛋白(ABCA1、ACLY、PP1B)表达水平。

1.12 统计学处理

应用SPSS 26统计软件进行统计分析,以GraphPad Prism 9.5.0软件绘图。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本比较采用独立样本 t 检验,多样本比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KLTi单用或联用DDP在体外对A549细胞的细胞毒作用及 IC_{50} 值的确定

CCK-8法检测结果(图1)显示,KLTi、DDP对A549细胞的细胞毒作用具有时间效应及剂量效应依赖性,在干预A549细胞24及48 h时,KLTi对A549细胞的 IC_{50} 分别为15.650、2.248 mg/mL,DDP对A549细胞的 IC_{50} 分别为9.006、2.999 μ g/mL。考虑到KLTi为脂溶性制剂,

干预浓度太大会通过影响渗透压对细胞增殖产生影响,故选择48 h的IC₅₀并参考既往文献报道^[13]选择2 mg/mL进行后续实验。选择DDP 3 μg/mL进行后续实验。KLTi与DDP联合用药,以浓度依赖性方式降低A549细胞的存活率。

2.2 KLTi单用或联合化疗对A549细胞迁移、侵袭的抑制作用

为了排除细胞增殖对迁移、侵袭结果造成假阳

性的影响,故使用无胎牛血清的基础培养基进行了CON组的A549细胞培养及各干预组的药物配制。分别设置CON组、KLTi组、DDP组及KLTi+DDP组,药物干预48 h后,对细胞迁移率及侵袭细胞面积进行组间对比,结果显示,与CON组相比,KLTi组、DDP组及KLTi+DDP组A549细胞的迁移(图2A)、侵袭(图2B)均受到抑制($P<0.01$),且KLTi+DDP组的抑制作用较DDP组更加明显($P<0.05$)。

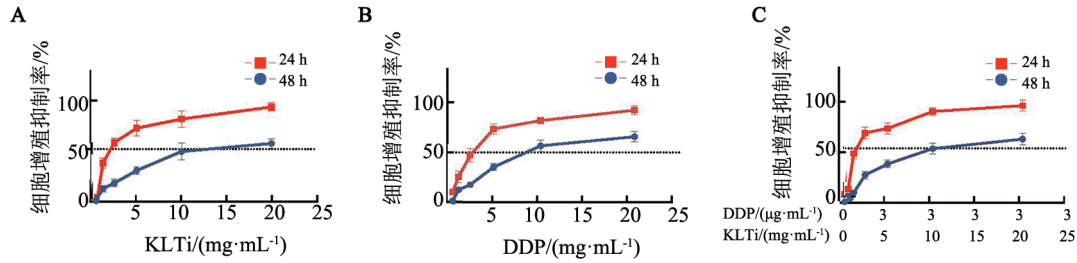
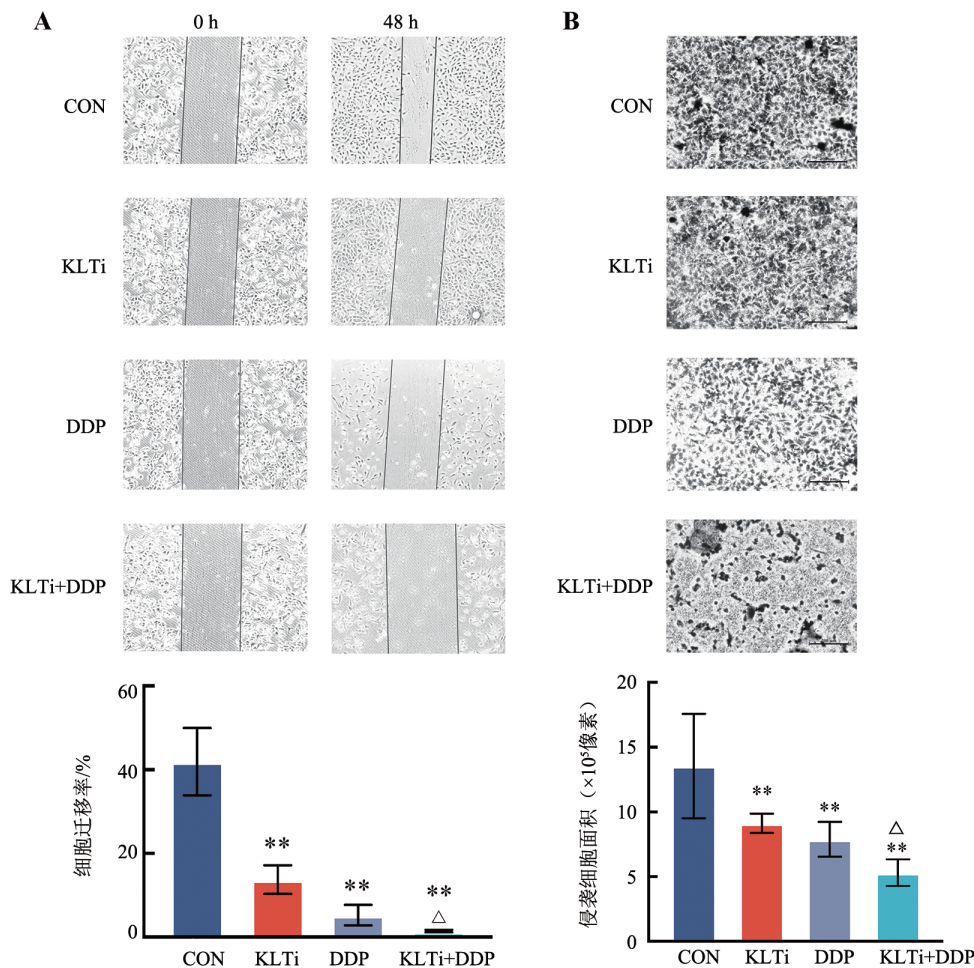


图1 KLTi(A)、DDP(B)、KLTi+DDP(C)对A549细胞的细胞毒作用



与CON组相比,** $P<0.01$;与DDP组相比,[△] $P<0.05$,标尺=200 μm。

图2 KLTi及DDP对A549细胞迁移(A)及侵袭(B,标尺=200 μm)的抑制作用

2.3 KLTi单用或联用DDP对A549细胞增殖的抑制和凋亡的促进作用

平板克隆形成实验结果显示(图3A),与

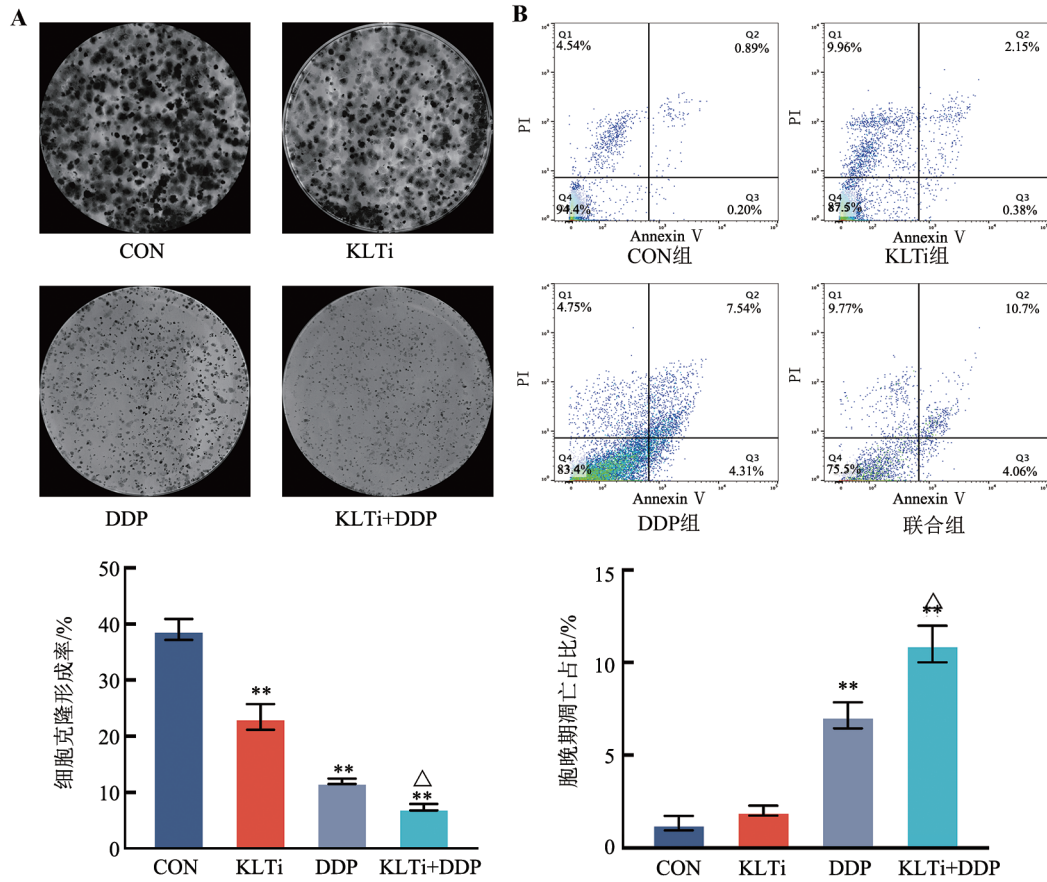
CON组相比,KLTi组、DDP组及KLTi+DDP组A549细胞的平板克隆形成率均显著降低(均 $P<0.01$),其中KLTi+DDP组克隆形成率较DDP组

更低 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果 (图 3B) 显示, 与 CON 组相比, DDP 组和 KLTi+DDP 组 A549 细胞的晚期凋亡水平均显著增加 ($P < 0.01$), 且 KLTi+DDP 组的促凋亡作用较 DDP 组更加明显 ($P < 0.05$), 然而单用 KLTi 组较 CON 组未见明显统计学意义的差异。

2.4 KLTi 在体外调控 A549 细胞 EMT 进程相关蛋白

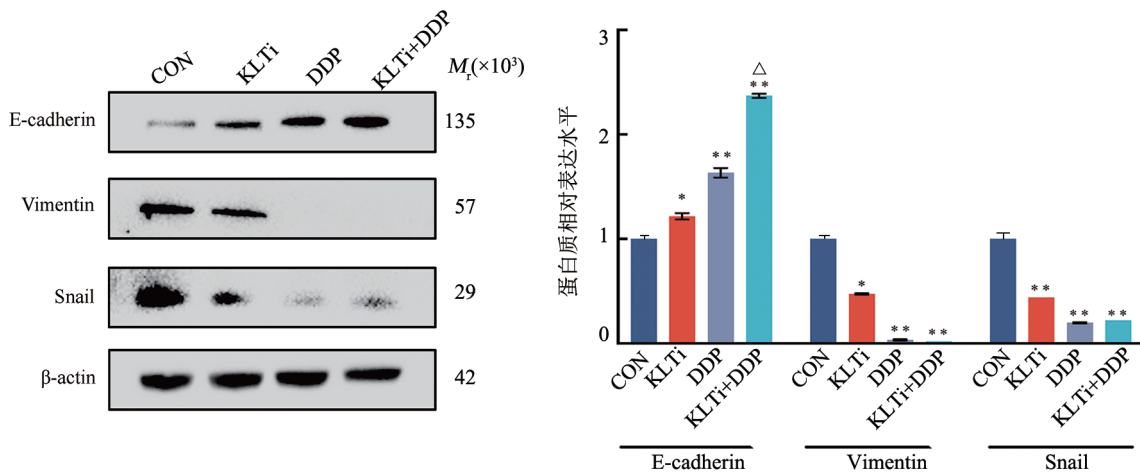
的表达水平

WB 法检测结果 (图 4) 显示, 与 CON 组相比, KLTi 组、DDP 组及 KLTi+DDP 组的 E-cadherin 的表达水平明显上调, 而 vimentin、snail 的蛋白表达水平明显下调 ($P < 0.05$ 或 < 0.01), 且 KLTi+DDP 组相关蛋白水平变化更为明显 ($P < 0.05$)。



与 CON 组相比, ** $P < 0.01$; 与 DDP 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 3 KLTi 及 DDP 对 A549 细胞的增殖抑制作用(A)及凋亡促进作用(B)



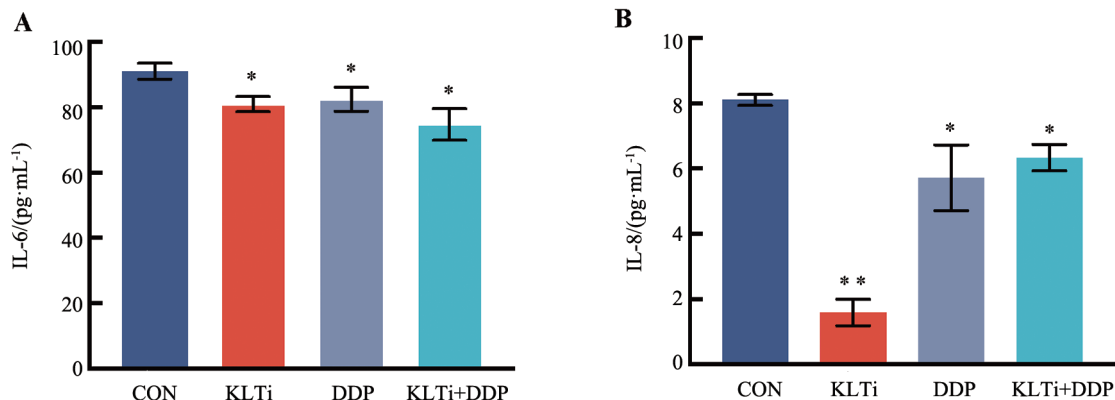
与 CON 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DDP 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 KLTi 及 DDP 对 A549 细胞 EMT 相关蛋白表达水平的调控作用

2.5 KLTi 单用或联用 DDP 对 A549 细胞 IL-6、IL-8 释放水平的调控作用

ELISA 检测结果(图 5)显示,与 CON 组相比,KLTi

组、DDP 组及 KLTi+DDP 组 A549 细胞培养上清液中 IL-6(图 5A)、IL-8(图 5B)水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中,KLTi 组 IL-8 水平降低最为显著。



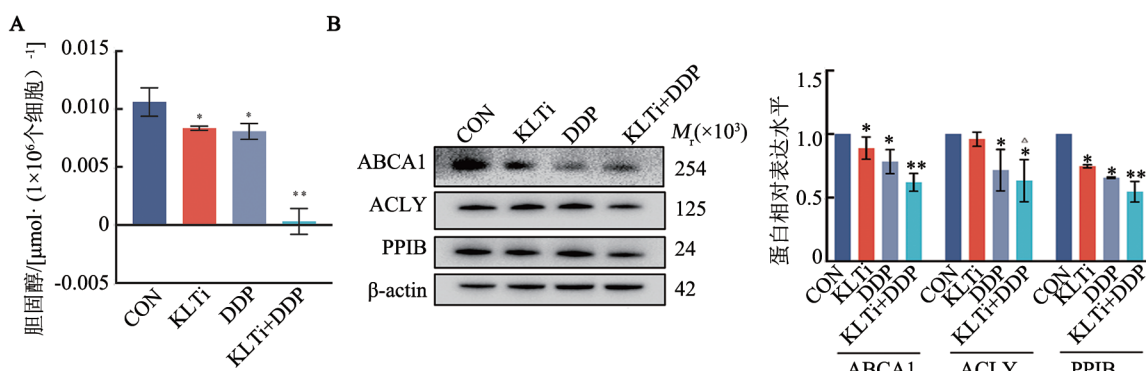
与 CON 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图 5 KLTi 及 DDP 对 A549 细胞 IL-6(A)、IL-8(B) 释放水平的调控作用

2.6 KLTi 单用或联用 DDP 调控 A549 细胞的胆固醇含量及代谢相关蛋白表达水平

比色法检测各组 1×10^6 个 A549 细胞中胆固醇含量水平变化及代谢相关蛋白表达水平,结果发现,

KLTi 单用或者联用 DDP 时均可降低 A549 细胞的胆固醇含量水平(图 6A),并调控代谢相关蛋白 ABCA1、ACLY、PPIB 的表达水平(图 6B),与 CON 组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。



与 CON 组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 DDP 组相比, $\Delta P<0.05$ 。

图 6 KLTi 单用及联用 DDP 对 A549 细胞胆固醇含量(A)及代谢相关蛋白(B)表达水平的调控作用

3 讨论

3.1 体外实验明确 KLTi 单用或联用 DDP 对肺腺癌 A549 细胞的抑制作用

侵袭及转移是恶性肿瘤细胞的本质特性之一,EMT 与肿瘤侵袭能力密切相关,是恶性肿瘤转移的关键步骤,使细胞更容易侵入基质、穿透血管等^[14-15],其主要特征是 E-cadherin 表达的下调或缺失,间质表型如 vimentin、snail 表达的获得或上调^[14]。因此,本课题组通过构建 NSCLC 细胞体外模型观察 KLTi 对 A549 细胞恶性行为学的影响,发现 KLTi 单独应用或联合 DDP,均可明显抑制 A549 细胞迁移、克隆形成

能力,且 KLTi+DDP 组的效果更加明显;当 KLTi 单用时,A549 细胞侵袭能力、晚期凋亡水平均较 CON 组有下降趋势(无统计学差异),而 KLTi+DDP 组细胞侵袭能力、晚期凋亡水平均较 CON 组及 DDP 组显著下降。进一步开展对 KLTi 单独应用或联合 DDP 调控 EMT 相关蛋白(E-cadherin、vimentin、snail)表达水平的研究,结果发现,单纯应用 KLTi、单纯应用 DDP、联合应用 KLTi 和 DDP 均可明显上调 E-cadherin 蛋白表达水平,明显下调 vimentin、snail 蛋白的表达水平,并且联合应用 KLTi 和 DDP 效果更加明显,从而抑制肺腺癌 A549 细胞发生 EMT。

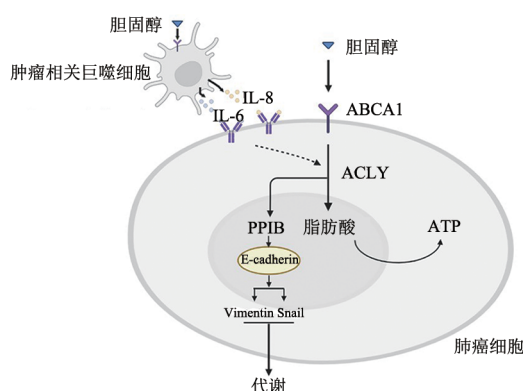
前期研究已证实,肿瘤细胞释放的促炎因子

IL-6、IL-8 与 EMT 存在串扰效应, 可驱动 EMT 发生, 而发生 EMT 的肿瘤细胞的促炎因子的释放水平进一步升高, 从而形成恶性循环^[6]。因此, 本课题组探索 KLTi 单用或联用 DDP 是否对 A549 细胞释放促炎因子 IL-6、IL-8 具有调控作用, 结果发现, KLTi 单用或者联用 DDP 均可以明显下调 A549 细胞的 IL-6、IL-8 释放水平。其中, 对于 IL-8 的释放水平, 在使用 DDP 进行干预后较 CON 组及 KLTi 组升高, 提示 DDP 联合 KLTi 可能泛泛而会促进 A549 细胞释放 IL-8。

3.2 基于胆固醇代谢探索 KLTi 对肺腺癌 A549 细胞的干预作用机制

胆固醇是生物膜的重要组成部分, 参与维持细胞膜磷脂双分子层的稳定性。既往研究^[17]证明胆固醇水平的升高是癌细胞增殖、肿瘤进展的标志。本课题组首先对不同药物干预后的 A549 细胞胆固醇水平进行检测及组间对比, 结果发现 KLTi 单独及联合 DDP 应用均可以明显降低 A549 细胞胆固醇含量, 并且对胆固醇代谢的相关通道 (ABCA1) 及功能蛋白 (ACLY、PPIB) 具有调控作用, 联合组的效果更加明显。

ABCA1 是一种与胆固醇稳态密切相关的膜蛋白。研究^[18]已证实, ABCA1 过表达可以升高肿瘤细胞中胆固醇水平并促进其增殖, 而抑制 ABCA1 表达可以通过降低胆固醇水平以抑制肿瘤细胞增殖。ACLY 是脂肪酸从头合成的关键酶, ACLY 敲低可以导致 A549 细胞增殖停滞^[19]; ACLY 抑制可以促进细胞内胆固醇流出^[20]。此外, 胆固醇及其代谢产物可以促进 PPIB 表达进而增强 A549 细胞增殖及侵袭能力^[21](图 7)。



胆固醇通过 ABCA1 进入肺癌细胞, 并通过 ACLY 调控合成脂肪酸, 产出 ATP 供给肿瘤细胞增殖, 胆固醇及其代谢产物可通过调控 PPIB 以促进肿瘤细胞发生 EMT, 从而发生迁移、侵袭。胆固醇亦可通过影响肿瘤相关巨噬细胞分泌促炎因子 IL-6、IL-8, 影响肺癌细胞胆固醇代谢进程, 从而促进肿瘤细胞恶性行为。

图 7 胆固醇代谢对肺癌细胞迁移与侵袭的促进作用

综上, 本课题组证实了 KLTi 单用或联合 DDP 在体外对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的抑制及对细胞晚期凋亡的促进作用, 这可能与调控胆固醇代谢进而影响 EMT 有关。

[参考文献]

- [1] ZHENG R, ZHANG S, ZENG H, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2016[J]. *Journal of the National Cancer Center*, 2022, 2(1): 1-9.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS HE, *et al.* Cancer statistics, 2022[J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33. DOI: 10.3322/caac.21708.
- [3] TRAVIS W D, BRAMBILLA E, NICHOLSON A G, *et al.* The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(9): 1243-1260. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- [4] BHATNAGAR R, DIXIT N M, YANG E, *et al.* Cancer therapy's impact on lipid metabolism: mechanisms and future avenues[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9:925816. DOI: 10.3389/fcvm.2022.925816.
- [5] LI X, LIU M H, LIU H Y, *et al.* Tumor metabolic reprogramming in lung cancer progression[J/OL]. *Oncol Lett*, 2022, 24(2): 287 [2023-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35814833/>. DOI: 10.3892/ol.2022.13407.
- [6] ZHANG C, ZHU N, LI H, *et al.* New dawn for cancer cell death: emerging role of lipid metabolism[J/OL]. *Mol Metab*, 2022, 63: 101529 [2023-07-08]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101529>. DOI: 10.1016/j.molmet.2022.101529.
- [7] LOOSEN S H, KOSTEV K, LUEDDE M, *et al.* Low blood levels of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol are positively associated with cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2022, 148(11): 3039-3046. DOI: 10.1007/s00432-021-03867-1.
- [8] WILSON A, GARMO L C, PODGORSKI I. Interplay between fat cells and immune cells in bone: impact on malignant progression and therapeutic response[J/OL]. *Pharmacol Ther*, 2022, 238: 108274 [2023-07-08]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108274>. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108274.
- [9] YIN K, YOU Y, SWIER V, *et al.* Vitamin D protects against atherosclerosis via regulation of cholesterol efflux and macrophage polarization in hypercholesterolemic swine[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(11): 2432-2442. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306132.
- [10] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [11] CHENG C M, GENG F, CHENG X, *et al.* Lipid metabolism reprogramming and its potential targets in cancer[J/OL]. *Cancer Commun (Lond)*, 2018, 38(1): 27 [2023-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784041/>. DOI: 10.1186/s40880-018-0301-4.
- [12] 许博文, 李释心, 李杰, 等. 基于网络药理学的康莱特注射液治疗非小细胞肺癌的分子生物学机制研究[J]. *海南医学院学报*, 2020, 26(16): 1250-1258. DOI: 10.13210/j.cnki.jhmu.20200410.003.
- [13] 吕品田, 周坤, 王亚珍, 等. 薏苡仁注射液(康莱特)联合顺铂对人

- 肺腺癌细胞 A549 抑制作用及机制[J]. 中成药, 2011, 33(3): 393-396. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2011.03.007.
- [14] THIERY J P, ACLOQUE H, HUANG R Y J, *et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5): 871-890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- [15] SHAO N, XIAO Y, ZHANG J X, *et al.* Modified sijunzi decoction inhibits epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer by attenuating AKT/GSK3 β pathway *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. Front Pharmacol, 2022, 12: 821567[2023-07-08]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.821567>. DOI: 10.3389/fphar.2021.821567.
- [16] CHATTOPADHYAY I, AMBATI R, GUNDAMARAJU R. Exploring the crosstalk between inflammation and epithelial-mesenchymal transition in cancer[J/OL]. Mediat Inflamm, 2021, 2021: 9918379 [2023-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34220337/>. DOI: 10.1155/2021/9918379.
- [17] XU H J, ZHOU S, TANG Q L, *et al.* Cholesterol metabolism: new functions and therapeutic approaches in cancer[J/OL]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1874(1): 188394[2023-07-08]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32698040/>. DOI: 10.1016/j.bbcan.2020.188394.
- [18] WANG M S, HAN Q S, JIA Z R, *et al.* PPAR α agonist fenofibrate relieves acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer by promoting apoptosis *via* PPAR α /AMPK/AKT/FoxO1 pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(1): 167-176. DOI: 10.1038/s41401-021-00638-z.
- [19] MIGITA T, NARITA T, NOMURA K, *et al.* ATP citrate lyase: activation and therapeutic implications in non-small cell lung cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(20): 8547-8554. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-1235.
- [20] XIE Z, ZHANG M, SONG Q, *et al.* Development of the novel ACLY inhibitor 326E as a promising treatment for hypercholesterolemia[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(2): 739-753. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.06.011.
- [21] LI X K, CHEN H C, ZHANG L Z, *et al.* 27-hydroxycholesterol linked high cholesterol diet to lung adenocarcinoma metastasis[J]. Oncogene, 2022, 41(19): 2685-2695. DOI: 10.1038/s41388-022-02285-y.
- [收稿日期] 2023-07-08 [修回日期] 2023-10-10
[本文编辑] 黄静怡, 沈志超